

Binäre Codierung von Verbindungsbibliotheken

Peter Eckes*

Die supramolekulare Chemie hat sich im letzten Jahrzehnt zu einem neuen Forschungsschwerpunkt der Chemie entwickelt. Das Denken in supramolekularen Funktionseinheiten hat insbesondere die Betrachtungsweise biologischer Vorgänge beeinflusst. Durch die modernen Methoden der Molekularbiologie, der Gentechnik und der Strukturanalyse wurde die Voraussetzung für das Verständnis von supramolekularen Wechselwirkungen in biologischen Systemen geschaffen. Trotz dieser Erkenntnisse steckt das rationale De-novo-Design von Arznei- und Pflanzenschutzwirkstoffen, die gezielt durch supramolekulare Wechselwirkungen in biologische Vorgänge eingreifen, noch in den Kinderschuhen.

Ein wichtiges Standbein in der Wirkstoffsuchforschung bleibt daher nach wie vor das Zufalls-Screening, das ebenfalls von den Fortschritten in den Biowissenschaften profitiert hat. Effiziente Testsysteme ermöglichen es, jährlich viele tausend Verbindungen auf ihre Wirkung am molekularen Target zu untersuchen. Getestet werden dabei neben einzelnen Syntheseprodukten auch Substanzgemische, wie sie in Pflanzenextrakten, Extrakten mariner Lebewesen oder in Fermentationsbrühen vorkommen.

Angeregt durch die molekulare Vielfalt von biologischen Systemen haben Chemiker in den letzten drei Jahren Methoden für die Synthese von Verbindungsbibliotheken entwickelt, um schneller funktionstragende Moleküle zu identifizieren. Diese Arbeiten scheinen einen Paradigmawechsel in der Synthesechemie darzustellen. In den neuen Zweig der Synthesechemie sind Konzepte der Biologie eingeflossen. Das Ergebnis ist die kombinatorische Chemie, die auf die Bereitstellung von vielen strukturell unterschiedlichen Substanzen zielt.

Die Arbeiten zur kombinatorischen Chemie sind in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst worden^[1]. Der überwiegende Teil der bisher veröffentlichten Publikationen beschreibt die Synthese und Verwendung von Verbindungsbibliotheken aus Biooligomeren. Für die Bevorzugung von Peptid- und Oligonucleotidbibliotheken gibt es zwei maßgebliche Gründe: 1) Ihre Synthese wurde seit den grundlegenden Arbeiten von Merrifield und Letsinger immer weiter perfektioniert, und 2) existieren hervorragend ausgearbeitete Verfahren, um die Struktur der Verbindungen auch mit kleinsten Substanzmengen bestimmen zu können. Die besondere Herausforderung bei der Erweiterung der Konzepte der Peptid- und Oligonucleotidbibliotheken auf Verbindungsbibliotheken kleiner organischer

Moleküle ist die Strukturidentifizierung von supramolekular wechselwirkenden Komponenten aus den „kombinatorisch hergestellten“ Synthesegemischen.

Der erste Lösungsvorschlag für dieses Problem stammt von Brenner und Lerner^[2]. Ihr Konzept ist die Erzeugung einer codierten Verbindungsbibliothek durch Kombination der Split-Methode^[3] (siehe Schema 2) mit zwei aufeinanderfolgenden kombinatorischen Syntheseschritten. In der Synthese wird im ersten kombinatorischen Schritt, dem Codierungsschritt, die Information über das im zweiten kombinatorischen Syntheseschritt verwendete Edukt gespeichert. Ist ein Syntheseprodukt im späteren Test „aktiv“, so kann über die Sequenzinformation des Codes auf die Struktur der aktiven Verbindung zurückgeschlossen werden, und zwar unabhängig von der verwendeten Synthesechemie.

Am Beispiel von Peptidbibliotheken konnte der Beweis für die Richtigkeit des Konzepts erbracht werden. Während Nielsen et al.^[4], entsprechend dem Vorbild der Natur, auf einen Oligonucleotidcode zurückgreifen, verwenden Kerr et al.^[5] einen Aminosäurecode. Trotz der Entkopplung von Synthesechemie und Analytik scheinen beide Codierungsverfahren einige intrinsische Probleme mit sich zu bringen: 1) Die Synthesesequenz aus zwei kombinatorischen Teilreaktionen verlangt die Entwicklung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie für Verbindungsbibliothek und Code. 2) Bei der Generierung einer molekularen Vielfalt, die durch die beiden kombinatorischen Schritte hergestellt wird, kann auch ein Codemolekül als supramolekularer Bindungspartner hervorgehen. 3) Speziell Oligonucleotide reduzieren die Zahl anwendbarer Reaktionen aufgrund ihrer chemischen Labilität.

Aufbauend auf dem Vorschlag von Lerner et al.^[2] haben Still et al.^[6] ein interessantes neues Konzept entwickelt, das die genannten Probleme zu lösen scheint und damit neue Zukunftsperspektiven für die kombinatorische Chemie schafft. In zwei kürzlich erschienenen Arbeiten^[6, 7] beschreiben die Autoren die Codierung von Peptidbibliotheken mit einem Binärcode.

In dem neuen Codierungsverfahren sind die Codemoleküle nicht sequenziell miteinander verknüpft. Die Decodierung erfolgt damit nicht durch Ermittlung einer Sequenzinformation, sondern aus der formalen Zuordnung von Binärcodes für einzelne Codemoleküle und ihre Mischungen. Das Prinzip der Codierung ist in Tabelle 1 aufgezeigt.

Ein kurzes Zahlenbeispiel soll die Leistungsfähigkeit dieser Codierungsstrategie demonstrieren: Mit X Codemolekülen können $2^X - 1$ Edukte pro Reaktionsschritt codiert werden. In einer N -stufigen Reaktionssequenz ist es damit unter Verwen-

[*] Dr. P. Eckes

BASF AG, Hauptlaboratorium, ZH/W
D-67056 Ludwigshafen
Telefax: Int. + 621/60-21236

Tabelle 1. Codierung von Verbindungsbibliotheken durch einen Binärcode: Die Buchstaben A–F stehen symbolisch für die verwendeten Edukte, T₁–T₄ für die Codemoleküle.

Edukt	Schritt	Binärcode	Codemolekül
A	1	10	T ₁
B	1	01	T ₂
C	1	11	T ₁ + T ₂
D	2	10	T ₃
E	2	01	T ₄
F	2	11	T ₃ + T ₄

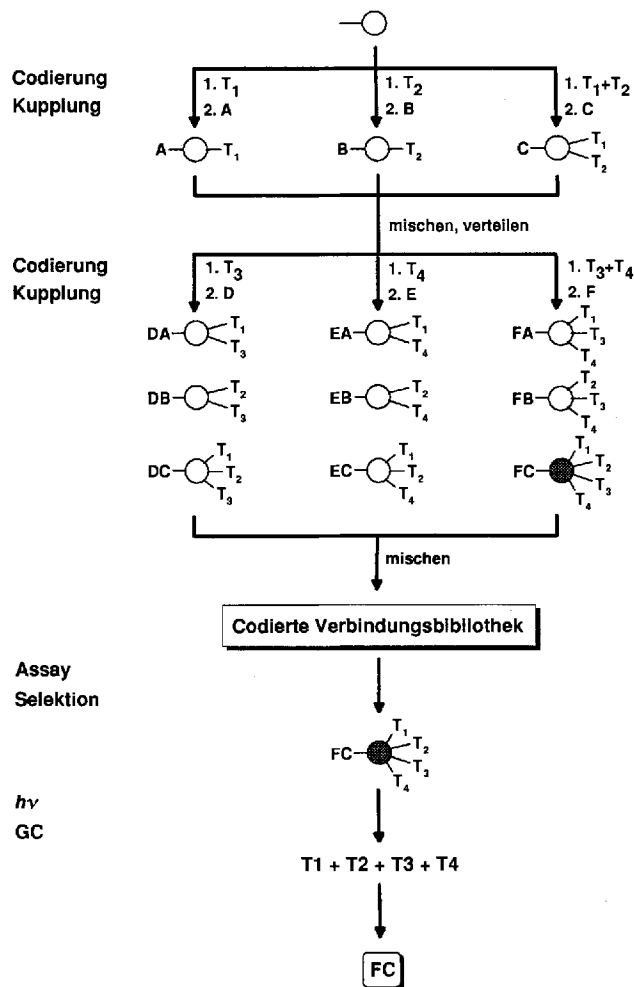
dung kombinatorischer Prinzipien möglich, mit nur $X \cdot N$ Molekülcodes eine Verbindungsbibliothek von $(2^x - 1)^N$ Komponenten eindeutig zu verschlüsseln. Beispielsweise ermöglichen 20 Codemoleküle in einer vierstufigen Sequenz die Codierung von 923 521 Verbindungen.

Als Codemoleküle fungieren eine Reihe von homologen Chlorfluorarenen, die sich mit Kapillargaschromatographie auftrennen lassen. Durch Elektronen-Einfang-Detektoren können die Codemoleküle noch in attomolaren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Schema 1 zeigt den Aufbau der Codemoleküle nach einem einfachen Baukastenprinzip. Die Anknüpfung der Codemoleküle gelingt durch Kupplung an einen festen Träger über Amidbindungen, wobei nur ein kleiner Teil (<1%) der freien Aminogruppen des Trägers in jedem Reaktionsschritt genutzt wird. Die spätere Abspaltung erfolgt photochemisch durch Spaltung des *o*-Nitrobenzyl-Linkers.

Schema 2 verdeutlicht die Vorgehensweise beim Aufbau einer binär codierten Peptidbibliothek. In separaten Reaktionsgefäßen wird der polymere Träger individuell mit dem molekularen Barcode etikettiert. Danach erfolgt – immer noch in getrennten Reaktionsgefäßen – die eigentliche Kupplungsreaktion mit den verschiedenen Aminosäuren. Es besteht somit jeweils eine Eins-zu-Eins-Korrespondenz von Codemolekül und Kupplungsprodukt. Durch Mischen und Verteilen der Trägerpartikel werden definierte Gemische erhalten, die wieder in gleicher Weise zunächst codiert und danach funktionalisiert werden.

Die resultierende Verbindungsbibliothek wird in funktionalen Assays gescreent und Trägerpartikel identifiziert, die binden-

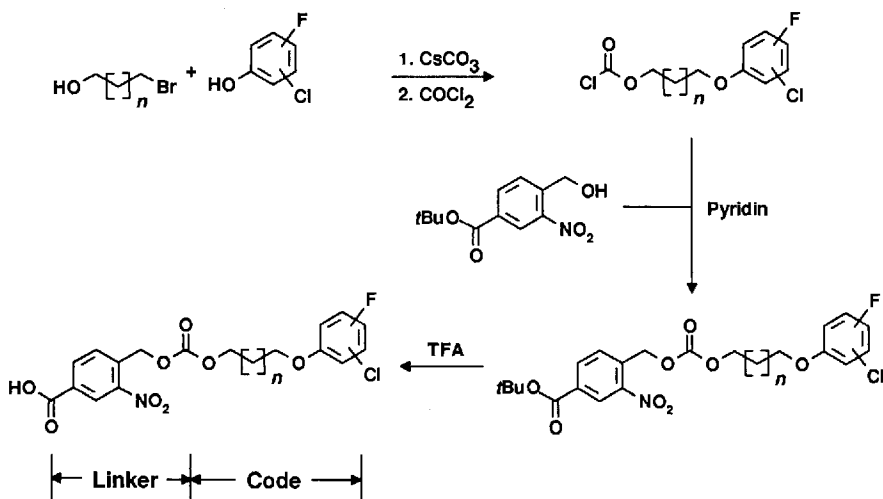


Schema 2. Aufbauprinzip einer Verbindungsbibliothek, die durch einen Binärcode codiert ist, und Prinzip der Selektion von Strukturen aus dieser Bibliothek, die in einem supramolekularen Ensemble wechselwirken. –○– entspricht dem Träger.

de Moleküle tragen. Nach Selektion eines Partikels, photochemischer Abspaltung der trägergebundenen Codemoleküle und Silylierung kann der Code im Gaschromatogramm gelesen und damit die supramolekular wechselwirkende Verbindung identifiziert werden.

Ein Wermutstropfen der neuen Methode bleibt allerdings, daß nach der bisher beschriebenen Vorgehensweise^{16, 71} der Assay nach wie vor mit trägergebundenen Verbindungen erfolgt. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch unerwünschte Wechselwirkungen mit dem Träger Konformationsänderungen eintreten, die die Bindung beeinflussen.

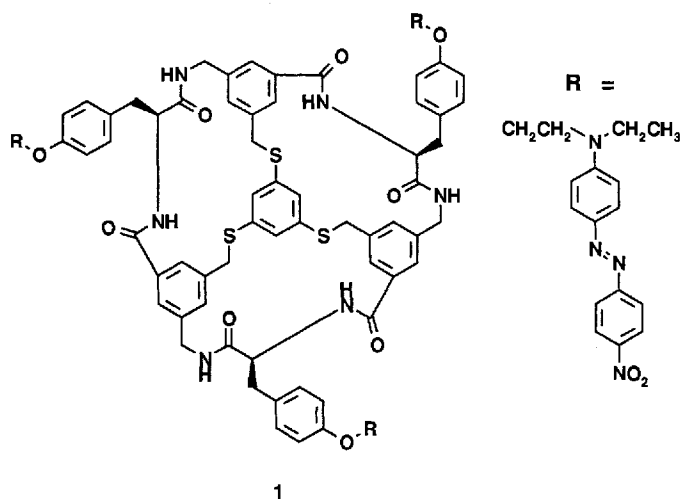
Als ersten Testfall^[6] wählten Still et al. eine codierte Peptidbibliothek von theoretisch 117 649 14er-Peptiden, die sie gegen einen monoklonalen murinen anti-c-MYC-Antikörper screenen. In der Peptidbibliothek wurden die sechs N-terminalen Aminosäuren variiert (H₂N–XXXXXXXXXEEEDLGGGG–Träger; X



Schema 1. Synthese der Codemoleküle. TFA = Trifluoressigsäure.

kann die Aminosäuren D, E, I, K, L, Q oder S sein). Um Partikel zu erkennen, an die der anti-c-MYC-Antikörper bindet, nutzten die Autoren die Farbreaktion eines zweiten, an alkalische Phosphatase gekuppelten Antikörpers. Sämtliche Peptidsequenzen, die über die Decodierung identifizierter Partikel ermittelt wurden, wiesen große Homologie zum MYC-Epitop auf. Sequenzabweichungen traten maximal in zwei Positionen auf. Als Kontrolle wurde die Affinität von fünf Peptiden in Lösung bestimmt. Alle gemessenen IC_{50} -Werte lagen im unteren mikromolaren Bereich.

Das zweite Beispiel^[7] zielte auf die Identifizierung eines peptidischen Liganden, der selektiv an den mit einem roten Azofarbstoff markierten synthetischen Rezeptor 1 (Schema 3) bindet.



Schema 3. Der mit einem Azofarbstoff R markierte synthetische Rezeptor 1.

Die von Still et al. für das Screening verwendete codierte Tripeptidbibliothek umfaßte L- und D-Aminosäuren und wies unterschiedlich acylierte N-Termini auf. Auch hier gelang es, eine ganze Reihe von Sequenzen zu identifizieren, deren beachtliche Affinität zum synthetischen Rezeptor 1 auch nach Synthese und Test in Lösung bestätigt werden konnte.

Mit diesen beiden Beispielen^[6, 7] konnten Still et al. die Tragfähigkeit ihres Konzepts unter Beweis stellen und zeigen, daß die kombinatorische Chemie ein interessantes Werkzeug zur Untersuchung supramolekularer Wechselwirkungen ist. Der Vorteil der Binärcodierung wird aber erst bei der Synthese von Verbindungsbibliotheken kleiner organischer Moleküle^[8] voll zum Tragen kommen.

Man darf gespannt sein, wie sich das Arbeitsgebiet der kombinatorischen Chemie weiterentwickelt.

- [1] Peptidbibliotheken: G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 357; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 375; Phagenbibliotheken: J. A. Wells, H. B. Lowman, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3*, 355; Peptidmimeticbibliotheken: R. N. Zuckermann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 580; Oligonucleotidbibliotheken: M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979; molekulare Vielfalt: M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387; W. H. Moos, G. D. Green, M. P. Pavia, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 315.
- [2] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381.
- [3] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487; K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [4] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812.
- [5] J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2529.
- [6] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922.
- [7] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373.
- [8] C. Chen, L. A. A. Randall, R. B. Miller, A. D. Jones, M. J. Kurth, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2661.

Neue ionische isoelektronische Analoga von CO₂ und CS₂

Thomas M. Klapötke*

Einige isoelektronische Analoga von CO₂ sind bereits seit längerer Zeit bekannt und gut charakterisiert. Hierzu zählen das neutrale N₂O ($D_{\infty v}$) sowie die Ionen N₃⁻ ($D_{\infty h}$), CN₂²⁻ ($D_{\infty h}$) und NO₂⁺ ($D_{\infty h}$)^[1]. Besonders in den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet dieser einfachen X=Y=Z-Teilchen mit 22 Elektronen (16 Valenzelektronen) große Fortschritte gemacht. So wurden alle (vibratorisch) stabilen Vertreter X=Y=Zⁿ (4- ≤ n ≤ 4+) der zweiten Periode mit quantenmechanischen ab-initio-Korrelationsverfahren charakterisiert^[2]. Neben einigen inzwischen experimentell zugänglichen Vertretern, z.B. CBN⁴⁻ und C₃⁴⁻, und deren höheren CS₂-Analoga weisen auch beispielsweise Kat-

ionen wie O₃²⁺ und FNF³⁺ nach diesen Rechnungen lokale Energieminima auf^[2].

Die derzeit bekannten und durch Röntgenbeugung strukturell gut charakterisierten ionischen isoelektronischen Analoga des CO₂ sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Vom höheren Homologen des CO₂, dem CS₂, konnten die isoelektronischen Ionen NS₂⁺, PCS⁻ und BP₂³⁻ hergestellt und kristallstrukturanalytisch untersucht werden. Darüber hinaus ist das zum CSe₂ isoelektronische BA₃²⁻ beschrieben worden ($d_{\text{BAS}} = 186.8 \text{ pm}$)^[3].

Die Bindungslängen in den zu CO₂ und CS₂ isoelektronischen Ionen spiegeln in allen Fällen Bindungsordnungen > 1 wider. Auch im erst kürzlich beschriebenen PCS⁻-Ion ist die C-S-Bindung mit 162 pm deutlich kürzer als eine Einfachbindung ($d_{\text{CS}}(\text{Thioether}) \approx 182 \text{ pm}$)^[7]. Allerdings ergab die NBO-

[*] Priv.-Doz. Dr. T. M. Klapötke
Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Technischen Universität
Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin
Telefax: Int. + 030/314-22168